

# BEST AVAILABLE COPY

24615-2024500-10361



## DELPHION

Log Out | Work Files | Saved Searches

RESEARCH  
My Account

PRODUCTS

INSIDE DELPHION

Search: Quick/Number Boolean Advanced Derwent Help

### The Delphion Integrated View

Get Now: <input checked="" type="checkbox"/> PDF   <a href="#">More choices...</a>	Tools: Add to Work File: <input type="button" value="Create new Work File"/> <input type="button" value="Add"/>
View: <a href="#">INPADOC</a>   Jump to: <input type="text" value="Top"/> <input type="button" value="Go to: Derwent"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Email this to a friend

Title: **JP08308565A2: TRIPEPTIDYL PEPTIDASE AND ITS PRODUCTION**

Derwent Title: New tripeptidyl peptidase for prodn. of tri:peptide(s) - obtd. by culturing microorganisms of Streptomyces genus. [Derwent Record](#)

Country: JP Japan  
Kind: A

Inventor: MURAO SAWAO;  
SHIN TAKASHI;

Assignee: MERCIAN CORP  
[News, Profiles, Stocks and More about this company](#)

Published / Filed: 1996-11-26 / 1995-05-17

Application Number: JP1995000142510

IPC Code: C12N 9/50; C12N 9/50;

Priority Number: 1995-05-17 JP1995000142510

Abstract:

**PURPOSE:** To obtain a new tripeptidyl peptidase by culturing a bacterium belonging to the genus Streptomyces and collecting its product, capable of industrially and efficiently producing a tripeptide useful in the field of a food industry.

**CONSTITUTION:** A bacterium belonging to the genus Streptomyces [e.g. Streptomyces herbaricolor TY-21 (FERM P-14,866), etc.] is cultured. A product is collected from the culture mixture to give a new tripeptidyl peptidase which hydrolyzes an oxidized insulin B chain from an N end in tripeptide units of Phe1Val2Asn3 and Gln4His5Leu6, acts on the coloring substrate of tripeptidyl peptidase but not on the coloring substrate of dipeptidyl



View  
Image

1 page

peptidase and endopeptidase, has an optimum pH in the vicinity of pH7.5, a stable pH at 6.5 to 9.0, an optimum temperature of about 45°C, is almost deactivated at >55°C and has about 40,000 molecular weight (SDS-PAGE method).

COPYRIGHT: (C)1996, JPO

Family:

None

Other Abstract

None

Info:



Nominate this for the Gallery...



THOMSON

Copyright © 1997-2005 The Thomson Corporation

[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) | [Help](#)

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-308565

(43)公開日 平成8年(1996)11月26日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/50			C 1 2 N 9/50	
// (C 1 2 N 9/50				
C 1 2 R 1:465)				

審査請求 未請求 請求項の数3 F D (全 9 頁)

(21)出願番号	特願平7-142510	(71)出願人	000001915 メルシャン株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号
(22)出願日	平成7年(1995)5月17日	(72)発明者	村尾 澤夫 大阪府堺市堀上緑町2-8-12
		(72)発明者	新 隆志 熊本県熊本市池田4-5-2吉永ビル505号
		(74)代理人	弁理士 大家 邦久

(54)【発明の名称】 トリペプチジルペプチダーゼおよびその製造方法

(57)【要約】

【構成】 ストレプトミセスに属する微生物を培養して得られる下記の性質を有するトリペプチジルペプチダーゼ、その製造方法及びそのトリペプチジルペプチダーゼを生産するストレプトミセス・ヘルバリコロールTY-21。

(1) Ala-Ala-Phe-pNAを基質としたとき、至適pHが7.5付近、安定pH範囲が6.5~9.0、作用温度範囲が20~70℃、至適温度が45℃；(2) pH7.5の緩衝液中で60分間保持したとき37℃まで安定、55℃で殆ど失活；(3) PMSFおよびAEBSFにより阻害される；(4) SDS-PAGEによる分子量が約40,000ダルトンである。

【効果】 本酵素は微生物起源のトリペプチジルペプチダーゼであり、食品工業等の分野で有用なトリペプチドを工業的に効率よく生産することができる。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】下記の性質を有するトリペプチジルペプチダーゼ。

## 1) 作用:

(1) 酸化インシュリンB鎖を基質として作用させた場合、N末端からPhe<sup>1</sup>Val<sup>2</sup>Asn<sup>3</sup>およびGln<sup>4</sup>His<sup>5</sup>Leu<sup>6</sup>のトリペプチド単位で加水分解する。

(2) 各種発色性基質を用いて反応させた場合、トリペプチジルペプチダーゼの発色基質であるAla-Ala-Phe-pNAおよびAla-Ala-Leu-pNAに作用するが、アミノペプチダーゼの発色基質のPhe-pNAおよびLeu-pNA、ジペプチジルペプチダーゼの発色基質のAla-Phe-pNA、およびエンドペプチダーゼの発色基質のCbz-Ala-Ala-Phe-pNAおよびCbz-Ala-Ala-Leu-pNAには全く作用しない。

2) 至適pH: Ala-Ala-Phe-pNAを基質として反応させ、遊離するパラニトロアニリドの量を410nmの吸光度により測定する方法での反応至適pHは7.5付近にある。

3) pH安定性: 種々のpHで、4℃にて24時間保持した場合、pH 6.5~9.0で安定した酵素活性を示す。

4) 至適温度: Ala-Ala-Phe-pNAを基質として反応させ、遊離するパラニトロアニリドの量を410nmの吸光度により測定する方法での反応至適温度は約45℃である。

5) 温度安定性: pH 7.5にて60分間保持し酵素活性を測定する方法で、37℃まで安定した酵素活性を示し、55℃を超えると殆ど失活する。

6) 阻害剤: フェニルメタンスルホニルフルオリド(PMSF)、4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホニルフルオリド(AEBSF)およびアンチパインにより阻害を受け、ズブチリシン阻害剤(SSI)、アルカリプロテアーゼ阻害剤(API-2)、エチレンジアミン四酢酸、タロペプチン、ベスタチンおよびアマスタチンでは殆ど阻害されない。

7) 分子量: SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定した分子量は約40,000ダルトンである。

【請求項2】ストレプトミセス(*Streptomyces*)に属する微生物を培養して得られる培養物から請求項1に記載のトリペプチジルペプチダーゼを採取することと特徴とするトリペプチジルペプチダーゼの製造方法。

【請求項3】請求項1に記載のトリペプチジルペプチダーゼ産生能を有するストレプトミセス・ヘルバリコロールTY-21(*Streptomyces herbaricolor* TY-21)(FERM P-14886)。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は新規なプロテアーゼに関する。さらに詳しくいえば、新規なトリペプチジルペ

2

チダーゼ、その製造方法およびそのトリペプチジルペプチダーゼを生産する微生物に関する。

## 【0002】

【従来技術およびその課題】食品として摂取される蛋白質は、胃および小腸において種々の蛋白質分解酵素(プロテアーゼ)の作用により完全に加水分解され、遊離アミノ酸の形で吸収されと考えられていた。しかしS. Adibiらがジペプチドおよびトリペプチドはそのままの形で、遊離アミノ酸よりも早い速度で腸管から吸収されることを明らかにして以来、蛋白質の消化吸収のメカニズムの研究が進み現在では蛋白質は胃および腸で消化を受けて、大部分はジペプチドおよびトリペプチドの形で、一部はアミノ酸の形で吸収され、ペプチドの腸管吸収効率はアミノ酸および蛋白質よりも優れていることが定説となっている。そこで食品工業等の分野においては、原料蛋白質から栄養素としての利用効率が改良されたペプチド、特にジペプチドあるいはトリペプチドに誘導して利用した製品が注目され研究開発が進められている。

【0003】蛋白質をトリペプチド単位で加水分解するプロテアーゼとして、従来動物の臓器などから抽出精製されたものが知られているが(Doebber T.W. et al., *Endocrinology*, 103, 1794 (1978)、McDonald J.K. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 126, 63-71 (1985)、Balow R.M. et al., *J. Biol. Chem.*, 258, 11622-11628 (1983)、Andersen & McDonald, *Am. J. Physiol.*, 253, 649-655 (1987))、動物由来のプロテアーゼは分離精製および生産性に問題があるため、蛋白質を工業的に多量に処理するためには、より効率的に生産できる微生物由来のプロテアーゼ(ジペプチジルペプチダーゼあるいはトリペプチジルペプチダーゼ)が求められている。従って、本発明の課題は蛋白質をトリペプチド単位で加水分解し、工業的生産に適した微生物起源の新規なトリペプチジルペプチダーゼ、その製造方法およびそのトリペプチジルペプチダーゼを生産する微生物を提供することにある。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは工業的に利用可能なトリペプチジルペプチダーゼを生産し得る微生物を求めてスクリーニングを行なった結果、熊本県の土壌から分離したストレプトミセス(*Streptomyces*)に属する一菌株が新規なトリペプチジルペプチダーゼを生産することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0005】本発明の酵素を生産する菌株は以下に述べるとおり、菌学的性質からストレプトミセス(*Streptomyces*)に属する一菌株と判断され、他の公知菌株との比較によりストレプトミセス・ヘルバリコロール(*Streptomyces herbaricolor*)に属する新規な菌株と同定された。本発明者らは本菌株をストレプトミセス・ヘルバリコロールTY-21(*Streptomyces herbaricolor* TY

-21) と命名した。

#### 【0006】菌学的性質

(1) 形態的特徴：分岐しながら良く伸長する基底菌糸の先に気中菌糸を着生し、その先端は直状ないし曲状の孢子鎖となる。孢子鎖の連鎖は20個未満である。孢子は直径1.0~1.2  $\mu\text{m}$ 、長さ1.2~1.5  $\mu\text{m}$ で、その表面は平滑である。

【0007】(2) 菌体成分：菌体を酸で加水分解し、セルロースTLC板で分離したところ、菌体中のジアミノピメリン酸の異性体はL型であった。

#### 【0008】(3) 各種培地上での生育状態：

(a) トリプトン・イーストエキス寒天培地 (ISP-1)：生育は中程度で、白色の気中菌糸をわずかに着生する。基底菌糸は無色である。

(b) イーストエキス・モルトエキス寒天培地 (ISP-2)：生育は良好で、白色の気中菌糸の上に灰色の孢子を産する。培養裏面はやや褐色となる。培地中に色素は見られない。

(c) オートミール寒天培地 (ISP-3)：生育は良好で、白色の気中菌糸の上に一部に灰色の孢子を産するが、孢子の一部は濃い灰色になる。培養裏面は無色で培地中の色素も見られない。

(d) 澱粉・塩類寒天培地 (ISP-4)：生育は良好で、ISP-3の場合とほぼ同様の性状を示す。

(e) グリセロール・アスパラギン寒天培地 (ISP-5)：生育は中程度で、気中菌糸は白色である。培養裏面は部分的に褐色化する。

(f) チロシン培地：生育は良好であるが、無色の基底菌糸のみで、気中菌糸、孢子は全く見られない。培地中にメラニン色素や他の可溶性色素は産生しない。

【0009】(4) 糖類の資化性：ブリードハム・ゴットリーブ基礎培地に各種糖類を加えた培地で資化性を調べたところ表1のようになった。

【表1】

ラフィノース	+
アラビノース	+
シュクロース	±
キシロース	±
フラクトース	-
イノシトール	-
マンノース	-
ラムノース	-

＋：資化する，－：資化しない，±：その中間

【0010】(5) 生育温度：25~32℃の温度範囲で生育良好、ただし20~35℃で成育可能。

(6) 生育pH：pH6~8で生育良好、pH5以下および9以上では生育しない。

【0011】以上の結果に基づき、菌学的性質をルシェバリエの菌体成分による放線菌の分類 [M. P. LeChevalier & H. A. LeChevalier, Int. J. Syst. Bacteriol., vol. 2

0, 435-443 (1970)] に当てはめ、他の菌株と比較すると本株はストレプトミセス (Streptomyces) 属に属することは明らかであり、また、シャーリングとゴットリーブがインターナショナル・ストレプトミセス・プロジェクト (International Streptomyces Project) の成果として発表したアイエスピー (ISP) 標準株の性状 [E. B. Shirling & D. Gottlieb, International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 18, 69-189 (1968), 同 vol. 18, 279-392 (1968), 同 vol. 19, 391-512 (1969), 同 vol. 22, 265-394 (1972)] と比較すると、類似の菌株ストレプトミセス・ヘルバリコロール (Streptomyces herbaricolor) の性状とは、本株がフラクトースを資化できない点、および孢子の連鎖が20個程度までと短い点が異なることを除き一致する。そこで、本菌株をストレプトミセス・ヘルバリコロール (Streptomyces herbaricolor) の一種と同定し、ストレプトミセス・ヘルバリコロール (Streptomyces herbaricolor) TY-21 と命名して、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-14886として寄託している。

#### 【0012】酵素の取得方法

TY-21株を用いて本発明のトリペプチジルペプチダーゼを得るためには、この菌株を適当な培地に接種し、常法に従って培養すればよい。なお、本発明の酵素を取得するために用いる微生物は、上記TY-21株に限られず、後記する特性を有する本発明のトリペプチジルペプチダーゼを生産するものであればいかなる菌株を使用してもよい。本発明において使用される培地は、本発明に係るストレプトミセス属の菌が増殖し、トリペプチジルペプチダーゼを生産し得るものならば任意の培地が用いられる。例えば、炭素源としては通常グルコース、グリセロール、ラクトース、デンプン等が用いられ、窒素源としてはミートエキス、ペプトン、脱脂大豆粉、酵母エキス、麦芽エキス、コーンステープリカー等が用いられるほか、リン酸塩、ナトリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム等の無機塩が添加される。

【0013】培養は好気的条件下で、例えば通気攪拌法や振とう培養法で行なう。培養温度は20~35℃の温度範囲で行なうが、生育の良好な25~32℃が望ましい。初発pHは6~7が望ましく、培養中のpHは7~9が望ましい。培養時間は12~30時間程度であり、トリペプチジルペプチダーゼ活性が最高に達した時に培養を終了すればよい。培養後、ろ過または遠心分離またはろ過法によって菌体を除きその上清液を粗酵素液として用いる。粗酵素液はそのまま使用することもできるが、一般の酵素の分離精製法に準じて分離精製することができる。すなわち、分離液に硫酸アンモニウムなどの塩類を添加し蛋白を沈殿させる塩析沈殿法、あるいはエタノール、アセトン等の親水性有機溶媒を添加し蛋白を沈殿させる溶媒沈殿法により沈殿物を得、乾燥粉末とし

て用いることもできる。また、さらにイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等の精製法を用いて活性純度の高い酵素標品を調製することもできる。

#### 【0014】酵素活性測定法

かくして得られた本発明の酵素の活性は以下の方法にて測定する。酵素サンプル溶液0.5mlに、5%ジメチルホルムアミド含有0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH 7.0)に1.0mMアラニル-アラニル-フェニルアラニル-パラニトロアニリド(Ala-Ala-Phe-pNA)を混合した溶液1.5mlを加え、37℃で10分間反応させる。その後、20%酢酸0.5mlを加えて反応を停止させ、410nmにおける吸光度を測定する。酵素活性を示す1酵素単位(Unit)は、37℃において1分間に1μmolのパラニトロアニリンを生成させる酵素量として定義した。

#### 【0015】酵素の性質

粗酵素液から沈澱法、および各種クロマトグラフィー法を組合わせて精製することにより得られた本発明酵素の性質は以下の通りである。

#### 【0016】(1) 作用:

(1) 酸化インシュリンB鎖を基質として作用させた場合、N末端からPhe-Val-AsnおよびGln-His-Leuのトリペプチド単位で加水分解する。

(2) 各種発色性基質を用いて反応させた場合、トリペプチジルペプチダーゼの発色基質であるAla-Ala-Phe-pNAおよびAla-Ala-Leu-pNAに作用するが、アミノペプチダーゼの発色基質のPhe-pNAおよびLeu-pNA、ジペプチジルペプチダーゼの発色基質Ala-Phe-pNA、およびエンドペプチダーゼの発色基質Cbz-Ala-Ala-Phe-pNAおよびCbz-Ala-Ala-Leu-pNAには全く作用しない。

【0017】(2) 作用pH範囲及び至適pH: Ala-Ala-Phe-pNAを基質とし、0.1Mクエン酸-リン酸水素二ナトリウム緩衝液(pH 3~6)、リン酸緩衝液(pH 6~8)、トリス塩酸緩衝液(pH 8~11)中で4℃、24時間保持した後、前記酵素活性測定法により相対活性を測定した。その結果は図1に示すとおりであり、作用pH範囲は5~10程度であり、至適pHは約7.5である。

【0018】(3) pH安定性: 0.1Mクエン酸-リン酸水素二ナトリウム緩衝液(pH 3~6)、リン酸緩衝液(pH 6~8)、トリス塩酸緩衝液(pH 8~11)中に4℃で24時間保ち残存活性を測定した。その結果は図2に示す通りであり、安定pH範囲はpH 6.5~9.0である。

【0019】(4) 作用温度範囲及び至適温度: Ala-Ala-Phe-pNAを基質とし、リン酸緩衝液(pH 7.5)中で各種温度において相対活性を測定し

た。その結果は図3に示すとおりであり、作用温度範囲は20~70℃であり、至適温度は45℃付近である。

【0020】(5) 温度安定性: リン酸緩衝液(pH 7.5)中に各種温度において60分間保持した後の残存活性を測定した。その結果、本酵素は図4に示すように5~37℃で安定であり、55℃を超えると失活した。

【0021】(6) 阻害剤の影響: 各種酵素阻害剤の本酵素に対する影響を調べた。すなわち、表2に示す各種酵素阻害剤の溶液と本酵素溶液を混合し、37℃において30分間保持した後の残存酵素活性を測定し表2の結果を得た。

#### 【0022】

#### 【表2】

表2: 阻害剤の影響

試薬	濃度	残存活性
無添加		100 %
PMSF	1.5mM	0 %
AEBSF	2.0mM	0 %
アンチパイン	0.2 mg/ml	29.0%
SSI	0.15mg/ml	97.2%
API-2	0.1 mg/ml	96.3%
EDTA	3.0mM	87.5%
タロペプチン	0.3 mg/ml	93.8%
ベスタチン	0.5 mg/ml	98.2%
アマスタチン	0.5 mg/ml	96.5%

PMSF: フェニルメタンスルホニルフルオリド

AEBSF: 4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホニルフルオリド

SSI: ズブチリシン阻害剤

API-2: アルカリプロテアーゼ阻害剤-2

EDTA: エチレンジアミン四酢酸

【0023】表2から明らかなように、セリンプロテアーゼの強力な阻害剤であるフェニルメタンスルホニルフルオリド(PMSF)および4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホニルフルオリド(AEBSF)によりほぼ完全に阻害を受け、アンチパインによってかなりの阻害を受ける。一方、ズブチリシン阻害剤(SSI)、アルカリプロテアーゼ阻害剤(API)-2、エチレンジアミン四酢酸、タロペプチン、ベスタチン、アマスタチンでは殆ど阻害されない。

【0024】(7) 分子量: 精製した本酵素をスラブゲル電気泳動を行なった結果は1バンドであり、SDS-PAGEにより分子量を求めると約40,000ダルトンであった。

#### 【0025】

【発明の効果】本発明は新規なトリペプチジルペプチダーゼ、その製造方法、およびそのトリペプチジルペプチダーゼを生産するストレプトミセス(*Streptomyces*)に属する微生物ストレプトミセス(*Streptomyces herbari color*)TY-21を提供したものである。本発明によ

る酵素は蛋白質をそのN末端からトリペプチド単位で加水分解する微生物起源のトリペプチジルペプチダーゼであり、食品工業等の分野で有用なトリペプチドを工業的に効率的に生産し得る道を開いたものである。

【0026】

【実施例】以下に実施例を示し本発明を具体的に説明するが本発明はこれらの実施例により何等限定されるものではない。下記の説明中特に記載がない限り表示濃度は重量%である。

【0027】実施例1：菌株の培養

\*表3および表4に示した各種炭素源、窒素源および無機塩（塩化ナトリウム）を含む培地（pH 7.0）を用い、500ml容の坂口コルベンに50ml仕込み、120℃、15分間蒸気加圧滅菌した後、ストレプトミセス・ヘルバリコロールTY-21を500μl植菌し、30℃にて24時間振盪培養した。この培養液を遠心分離し菌体を除去し上清液を得た。各培地に対する酵素活性を表3および表4に併せて示す。

【0028】

\*10 【表3】

培地番号	1	2	3	4	5	6	7	8
<u>炭素源 (%)</u>								
グルコース								
グリセロール	2	2	2	2				
ラクトース					2	2	2	2
水溶性澱粉								
<u>窒素源 (%)</u>								
ミートエキス	0.75				0.75			
ペプトン	0.75				0.75			
N-2アミン		1				1		
酵母エキス		0.2				0.2		
脱脂大豆			2				2	
コーンステイー								
ブリカー				2				2
<u>無機塩 (%)</u>								
NaCl	0.3	←	←	←	←	←	←	←
<u>酵素活性</u>								
( $\times 10^3$ Units/ml)	47	37	67	86	89	45	120	53

【0029】

※30※ 【表4】

培地番号	9	10	11	12	13	14	15	16
<u>炭素源 (%)</u>								
グルコース	1	1	1	1	2	2	2	2
グリセロール								
ラクトース								
水溶性澱粉	1	1	1	1				
<u>窒素源 (%)</u>								
ミートエキス	0.75				0.75			
ペプトン	0.75				0.75			
N-2アミン		1				1		
酵母エキス		0.2				0.2		
脱脂大豆			2				2	
コーンステイー								
ブリカー				2				2
<u>無機塩 (%)</u>								
NaCl	0.3	←	←	←	←	←	←	←
<u>酵素活性</u>								
( $\times 10^3$ Units/ml)	48	54	89	106	59	38	114	103

【0030】表3および表4より、炭素源としてラクトース2%、窒素源として脱脂大豆2%、塩化ナトリウム

0.3%、初期pH 6.0（培地7）がストレプトミセス・ヘルバニコロールTY-21の培養に適していることがわかる。

#### 【0031】実施例2：最適培地での菌株の培養

実施例1で調べた16の培地のうち最適と確認された培地7（初期pH 6.0）を使用し、培養時間と、培養液pH、酵素活性及び660nmにおける吸光度（A660）との関係を調べた。その結果、図5に示す通り18～24時間の培養で酵素活性は最高に達することが明らかとなった。

#### 【0032】実施例3：酵素の精製

実施例1の最適培地7で培養した培養液を3,000rpmで15分間遠心分離して菌体を除去し、培養上清2リットルを得た。得られた上清2リットルに固形硫酸（硫酸アンモニウム）を20%飽和になるように加え、硫酸20%飽和リン酸緩衝液（10mM, pH 8.0）にて平衡化したブチルトヨパール（Butyl-Toyopearl）650Mカラム（φ5.5×15cm）に供し、同緩衝液にて未吸着物を洗浄した。吸着したサンプルを20～0%飽和硫酸リン酸緩衝液（10mM, pH 8.0）のリニアグラジエントで溶出し、10mlずつ溶出液を分取し、活性分画を\*

\*回収した。

【0033】この活性分画に50%飽和になるように固形硫酸を加え、生じた沈澱物を10,000rpmで20分間遠心分離して回収し、最小量のリン酸緩衝液（10mM, pH 8.0）に溶解してセファデックス（Sephadex）G-75カラムクロマトグラフィー（φ2.6×60cm）に供し、溶出液を2.5mlずつ分取し、活性分画を回収した。

【0034】次いでこの活性分画をリン酸緩衝液（10mM, pH 7.5）に対して透析し、同緩衝液にて平衡化したDEAEトヨパール（DEAE-Toyopearl）650Mカラム（φ0.85×18cm）に供し、同緩衝液にて未吸着物を洗浄した。吸着したサンプルを0～0.5M塩化ナトリウム水溶液のリニアグラジエントにて溶出し、2.0mlずつ溶出液を分取し、活性分画を回収した。回収した活性分画をリン酸緩衝液（10mM, pH 7.5）に対して透析し、本操作を繰り返してクロマトグラフィーを行ない、活性分画を回収した。

【0035】得られた酵素サンプルをリン酸緩衝液（10mM, pH 7.5）に対して透析し、TSKゲルDEAE-5PWを用いたHPLCにより精製を行なった。

#### HPLC条件

ポンプ：TOSOH CCPM

ディテクター：TOSOH UV-8000

インテグレーター：TOSOH SC-8010

カラム：TSKゲルDEAE-5PW（φ0.5×10cm）

展開溶媒A：10mMリン酸（pH7.5）

B：10mMリン酸（pH7.5）+0.2M塩化ナトリウム

グラジエント：A100%→0%（B100%），40分間

流速：1.0ml/分

検出：A280nm

カラム温度：室温

分取単位：1.0ml

【0036】以上の精製工程毎における酵素の活性等を表5に示す。 ※【表5】

※

精製段階	総活性 (U)	総蛋白 (mg)	比活性 (U/mg)	収率 (%)	精製度
培養上清	167	16430	0.01	100	1
ブチルトヨパール650M	105	161	0.65	63	64
セファデックスG-75	93	86	1.08	55	106
1st. DEAEトヨパール	18	4.3	4.24	11	415
2nd. DEAEトヨパール	14	1.2	11.20	8	1120
TSKゲルDEAE-5PW	11	0.8	13.75	7	1380

【0037】実施例4：酵素の純度および分子量の測定  
実施例3で精製した酵素の純度検定を12%SDS-PAGEにより行なった。電気泳動はバイオラッド社（BIO-RAD）のスラブゲル電気泳動装置MINI 2Dを用い、12%ゲルにて5μg相当のサンプルを供し、200Vで30分間泳動を行なった。泳動終了後、ゲル

を0.05%クーマシー・ブリリアントブルー（Coomassie brilliant blue）R-250で染色し、7%の酢酸溶液で脱色した。これにより実施例3で精製した酵素は電気泳動的に単一の標品であることが確認された。また、b型ホスホリラーゼ（分子量94,000ダルトン）、ウシ血清アルブミン（分子量67,000ダルトン）、卵白アルブミ



ン（分子量43,000ダルトン）、カルボニックアンヒドラーゼ（分子量30,000ダルトン）、ダイズトリプシンインヒビター（分子量20,100ダルトン）およびリゾチーム（分子量14,300ダルトン）を用い同様に電気泳動を行ない、移動度と分子量の検量線を作成して実施例2で精製した酵素の分子量を測定した結果、その分子量は約40,000ダルトンであった。

【0038】実施例5：酸素のアミノ酸組成  
実施例2で得られた酸素標本をガラスチューブに入れ、6N塩酸を加え封管し、110℃で24時間加水分解を行ないアミノ酸組成を分析した。なお残基数は分子量を40,000ダルトンとして算出した。結果を表6に示す。

【0039】

【表6】

表6：アミノ酸組成

アミノ酸	残基数
Asx	45
Thr	27
Ser	30
Glx	34
Pro	20
Gly	47

*Ala	44
Cys	2
Val	34
Met	5
Ile	11
Leu	18
Tyr	9
Phe	11
Lys	22
His	8
Arg	12
Trp	検出せず
合計	379

Asx：アスパラギン酸またはアスパラギン、

Glx：グルタミン酸またはグルタミン。

【0040】実施例6

実施例3で得られた精製酵素を用い、表7に示す各種発色基質の分解試験を行なった。なお、分解試験は前記酵素活性測定の方法に準じて行ない、パラニトロアニリンの生成により活性の有無を調べた。結果を表7に示す。

【0041】

【表7】

基 質	活 性
Ala-Ala-Phe-pNA	+
Ala-Ala-Leu-pNA	+
Phe-pNA	-
Leu-pNA	-
Ala-Phe-pNA	-
Cbz-Ala-Ala-Phe-pNA	-
Cbz-Ala-Ala-Leu-pNA	-

Cbz：ベンジルオキシカルボニル、

活性+：パラニトロアニリンを生成する、

活性-：パラニトロアニリンを全く生成しない。

【0042】表7より、本酵素はトリペプチジルペプチダーゼの発色基質であるAla-Ala-Phe-pNAおよびAla-Ala-Leu-pNAには作用するが、アミノペプチダーゼの好適基質であるPhe-pNAおよびLeu-pNA、ジペプチジルペプチダーゼの好適基質であるAla-Phe-pNA、並びにスブチリシンなどのエンドペプチダーゼの好適基質であるCbz-Ala-Ala-Phe-pNAおよびCbz-Ala-Ala-Leu-pNAには全く作用しないことが分かる。

【0043】実施例7：基質特異性

HPLC条件

カラム：ニュークレオシル（Nucleosil）s C<sub>18</sub>（φ4×150mm）

展開溶媒A：0.05%トリフルオロ酢酸

B：0.05%トリフルオロ酢酸+80%アセトニトリル

グラジエント：A100%→0%（B100%），45分間

実施例3で得られた精製酵素を用いて酸化インシュリンB鎖に対する加水分解部位を調べた。すなわち、100mMリン酸緩衝液（pH 7.5）に溶解した酸化インシュリンB鎖（シグマ社製）1mg/mlの溶液1,000μlに酵素標品1μgを加え、37℃で反応させ、30、60、120分毎にサンプリングを行ない、最終濃度1Nになるように塩酸を加えて反応を停止した後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により分離、分取した。

【0044】

13

14

流速: 0.8ml/分

検出: A280nm

【0045】得られた3ピークの分取を行ない、アミノ酸（各アミノ酸の残基数およびN末端のアミノ酸）の分析を行ない、加水分解部位を決定した。その結果は表8に示す通りであり、本酵素は酸化インシュリンB鎖の、\*

\*Asn<sup>3</sup>Gln<sup>4</sup>の間およびLeu<sup>6</sup>Cys(SO<sub>3</sub>H)<sup>7</sup>間を切断することが分かった。

【0046】

【表8】

	分取1	分取2	分取3
アミノ酸分析			
Asx	0.9(1)		
Thr		0.9(1)	1.0(1)
Ser		1.1(1)	1.4(1)
Glx		3.1(3)	1.7(2)
Pro		0.8(1)	1.1(1)
Gly		2.9(3)	3.7(4)
Ala		1.8(2)	1.6(2)
Cysteinic acid		ND	ND
Val	1.0(1)	1.7(2)	2.5(2)
Leu		3.8(4)	3.1(3)
Tyr	1.0(1)	1.4(2)	0.9(1)
Phe		2.0(2)	2.3(2)
Lys		1.0(1)	1.6(2)
His		1.8(2)	0.9(1)
Arg		1.0(1)	1.0(1)
NH <sub>2</sub> 末端分析			
	Phe-Val-	Gln-His-	ND-Gly-
相当する			
基質の配列	Phe <sup>1</sup> ~ Asn <sup>3</sup>	Gln <sup>4</sup> ~ Ala <sup>30</sup>	Cys(SO <sub>3</sub> H) <sup>7</sup> ~ Ala <sup>30</sup>

ND: 検出せず。

【図面の簡単な説明】

【図1】 ストレプトミセス・ヘルバリコロールTY-21の生産するトリペプチジルペプチダーゼの作用pHと活性の関係を示すグラフである。

【図2】 ストレプトミセス・ヘルバリコロールTY-21の生産するトリペプチジルペプチダーゼの安定pH域を示すグラフである。

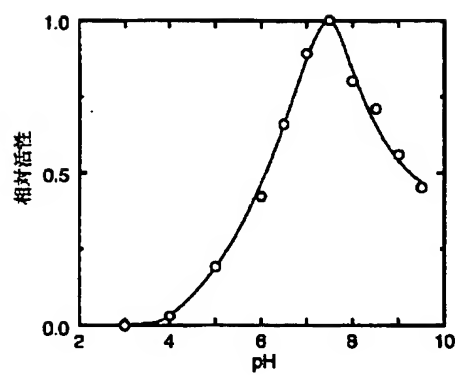
【図3】 ストレプトミセス・ヘルバリコロールTY-21の生産するトリペプチジルペプチダーゼの作用温度

と活性の関係を示すグラフである。

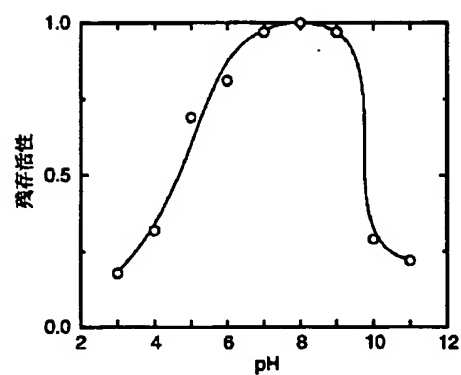
【図4】 ストレプトミセス・ヘルバリコロールTY-21の生産するトリペプチジルペプチダーゼの作用温度安定性を示すグラフである。

【図5】 最適培地でのストレプトミセス・ヘルバリコロールTY-21の培養時間と、培養液pH、酵素活性及び660nmにおける吸光度(A660)との関係を示すグラフである。

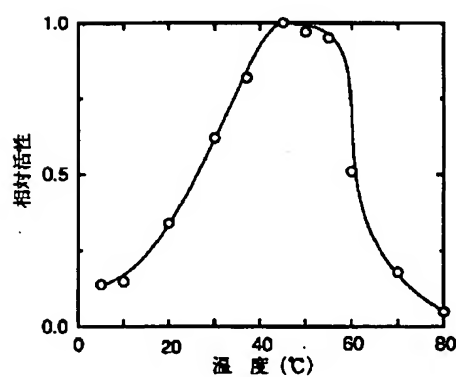
【図1】



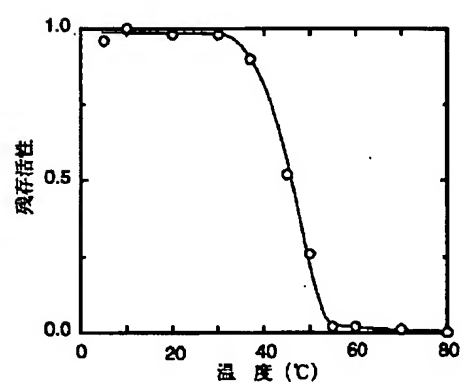
【図2】



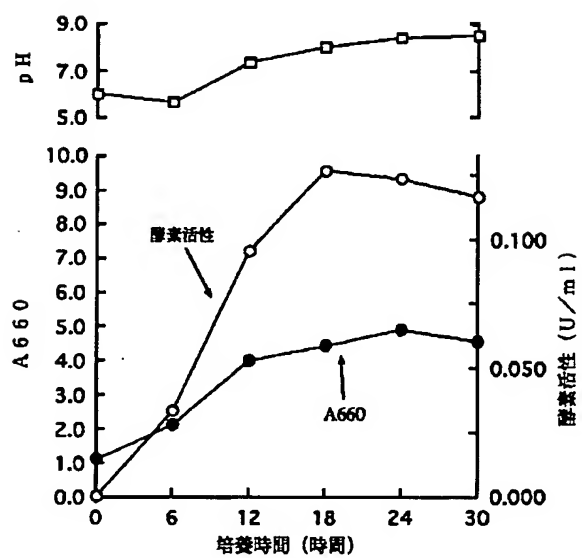
【図3】



【図4】



【図5】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**